

VII Curso de Actualización en Oncopatología y III Curso-Taller de Citometría de Flujo
Facultad de Medicina de la Universidad de Concepción
02 y 03 de mayo del 2019, Concepción, Chile

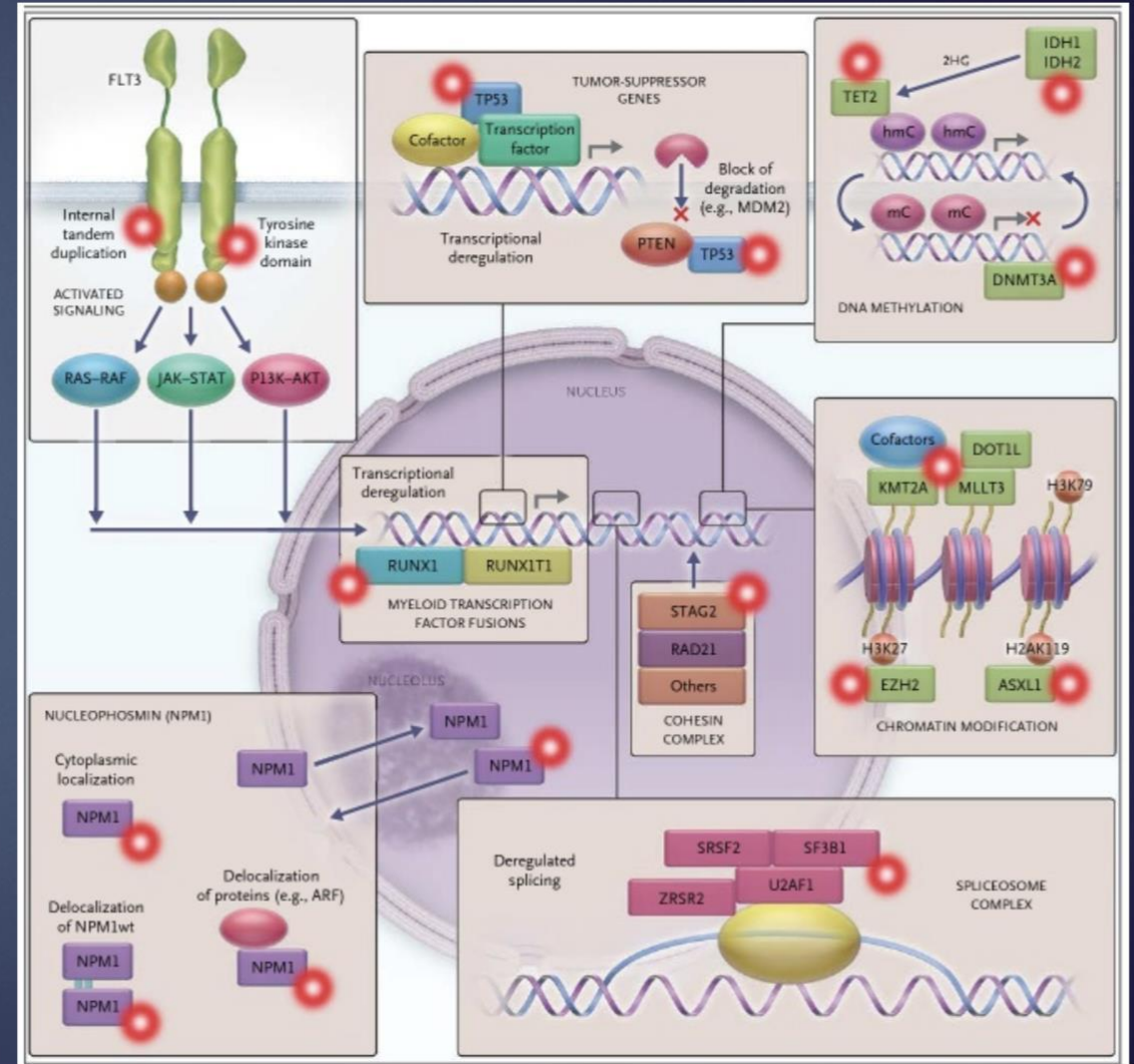
Aspectos teórico-prácticos sobre diagnóstico por biología molecular de LMA con FLT3+

Evangelina Agriello
Bahía Blanca, Argentina

Acute Myeloid Leukemia

Hartmut Döhner, M.D., Daniel J. Weisdorf, M.D., and Clara D. Bloomfield, M.D.

Categoría Funcional Cancer Genome Atlas Network	Alteraciones Genéticas
Señalización	Receptores de membrana Clase III con actividad de TK
Factores Transcripción	RUNX1 mut , RUNX1-RUNX1T1 CEBPA
Localización citoplasmática de proteínas	NPM1 shuttling protein
Spliceosoma Procesamiento RNA	SRSF2, SF3B1, U2AF1
Cohesin-complex Regulación de la segregación cromosómica – Transcripción	STAG2, RAD21
Metilación de Histonas	ASXL1, EZH2, KMT2A (MLL)
Metilación del ADN	DNMT3A, TET2, IDH1, IDH2
Genes supresores de tumor	TP53, MDM2

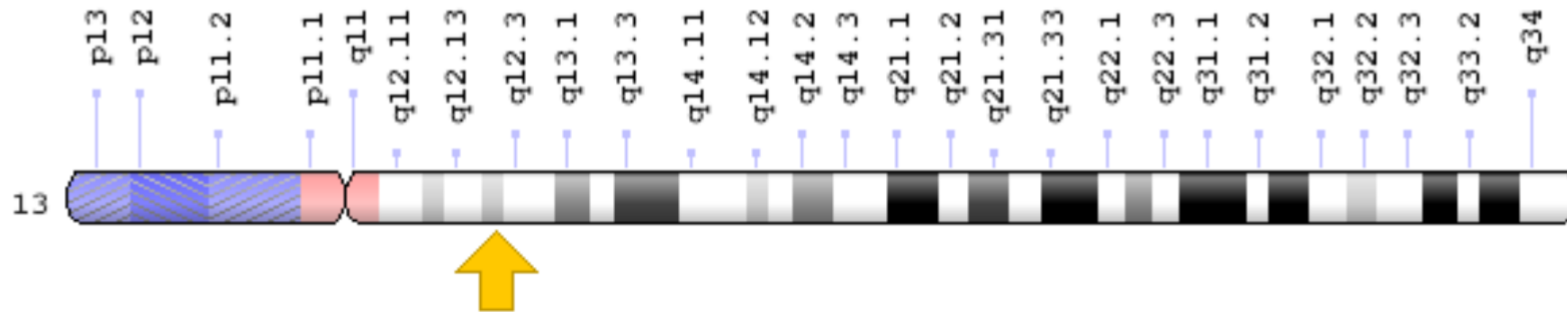


Qué es el FLT3?

- Receptor Tirosina-quinasa clase III
- Expresado en SC hematopoyéticas CD34+ y precursores de células dendríticas y NK, cerebro, cerebelo, placenta, hígado, timo, nódulos linfáticos, gónadas
- Su ligando se encuentra ligado a la membrana o como forma soluble
→ estimula las SC
- Rol importante en las etapas tempranas de la hematopoyesis para la supervivencia, proliferación y diferenciación de las SC

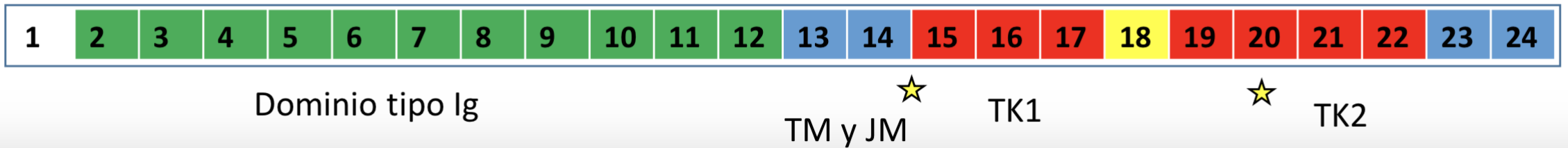
UBICACION

13q12

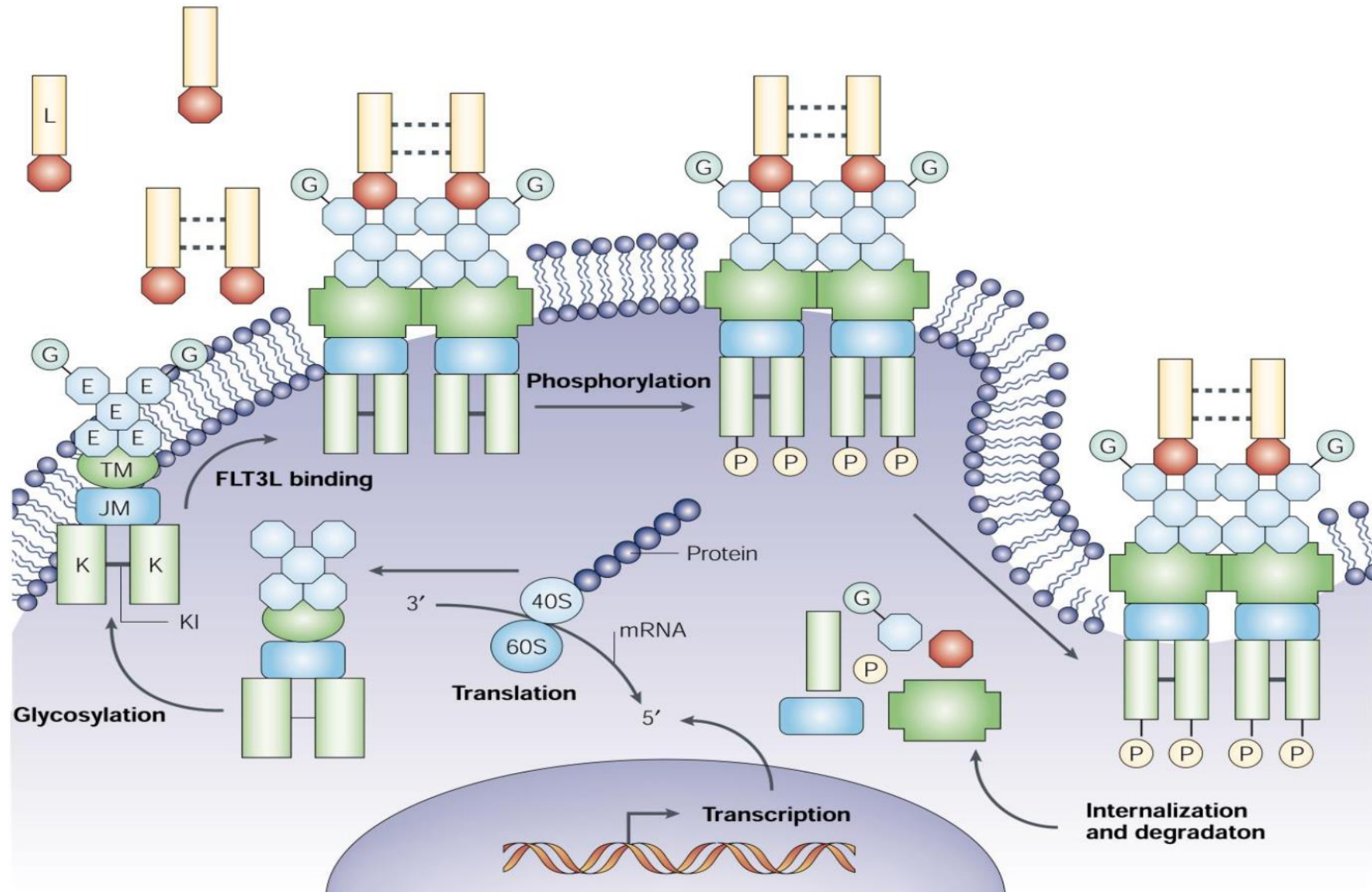


ESTRUCTURA

24 exones
96kb



ACTIVACION DE FLT3



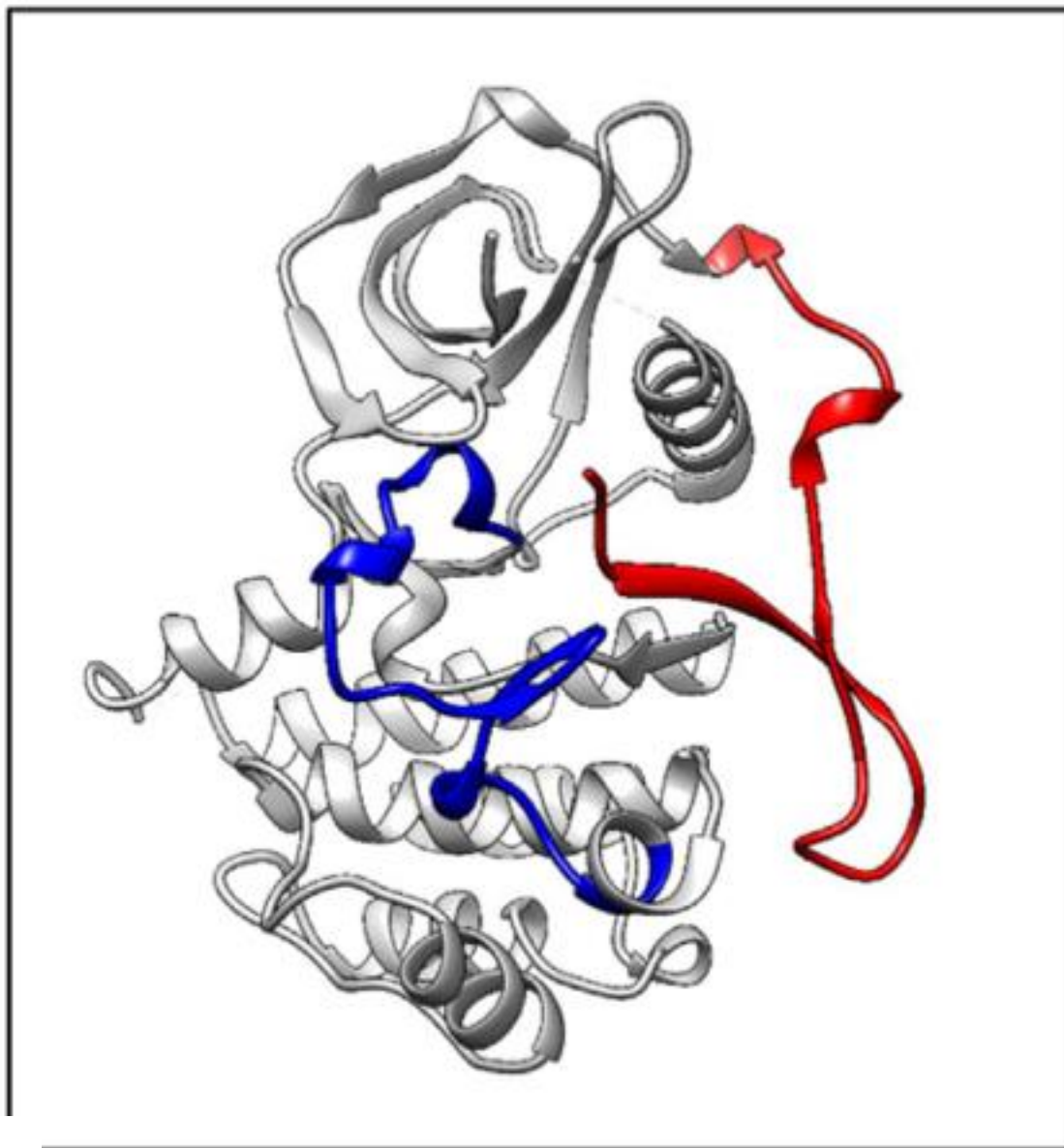
FLT3: procesos regulatorios de las células hematopoyéticas :

- Metabolismo de los fosfolípidos (PI3K)
- Transcripción
- Proliferación
- Apoptosis
- Estableciendo una conexión con la vía RAS

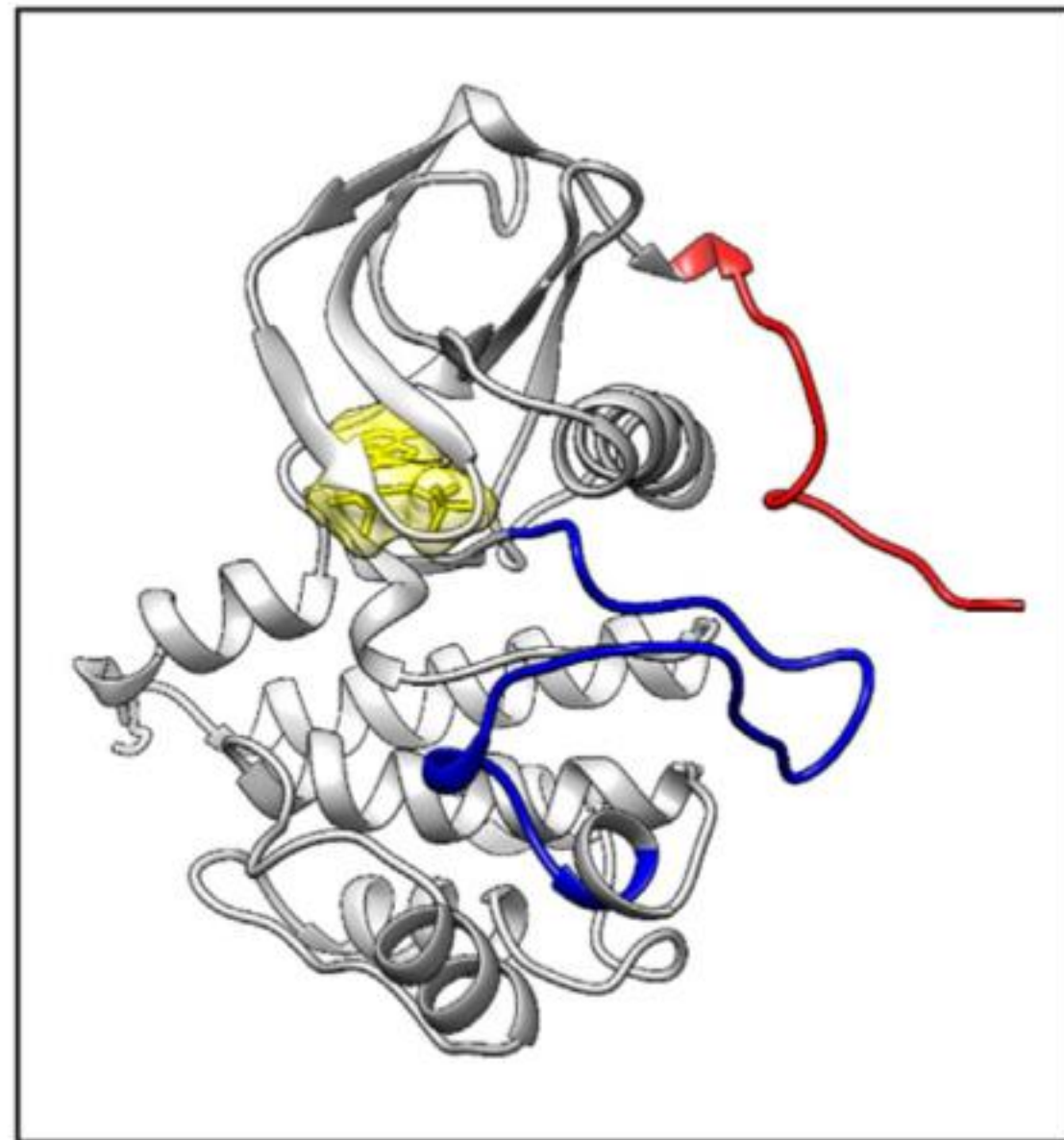
El receptor WT provoca la activación de señales de traducción a través de:

- PI3K/AKT RAS/RAF/MEK JAK/STAT

FLT3



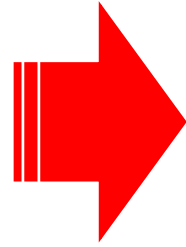
Inactive



Active

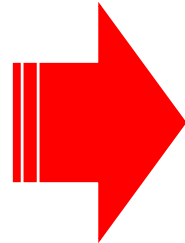
JM rojo
A-loop azul
ADP amarillo

Alteraciones genéticas



Rc. activado constitutivo,
independiente del ligando

Proceso leucemogénesis

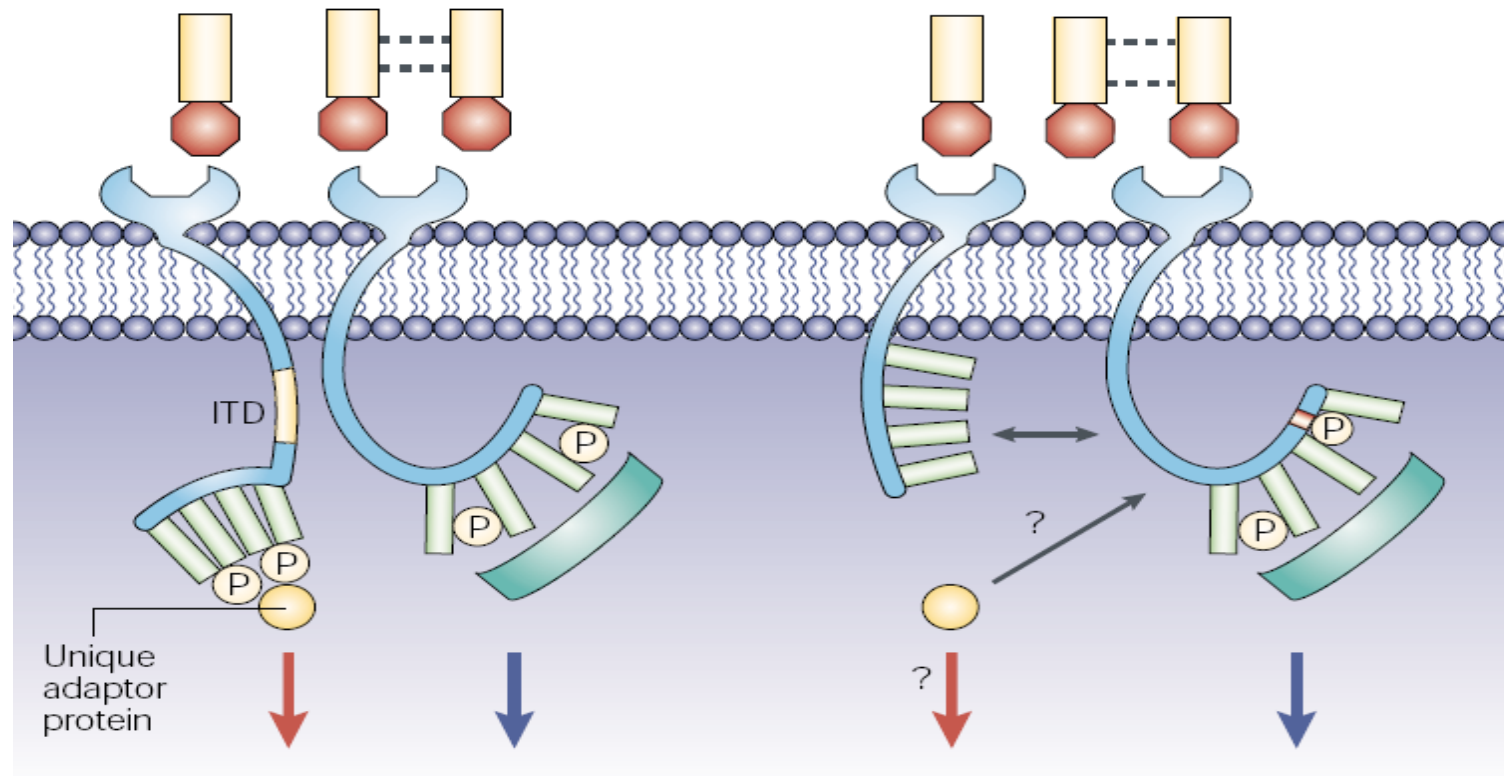


30%LMA de novo

- **Duplicaciones internas en Tandem (FLT3-ITD)**
- **Mutaciones puntuales**

Inhibidor multikinasa

Midoustaaurina



Autofosforilación constitutiva del Rc FLT3



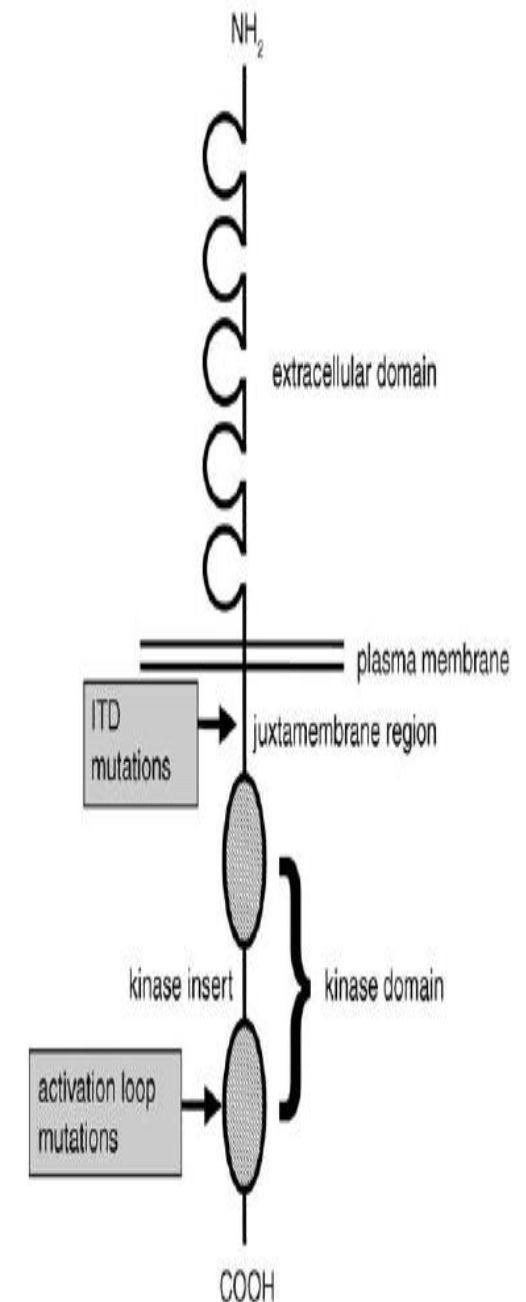
gana funcionalidad

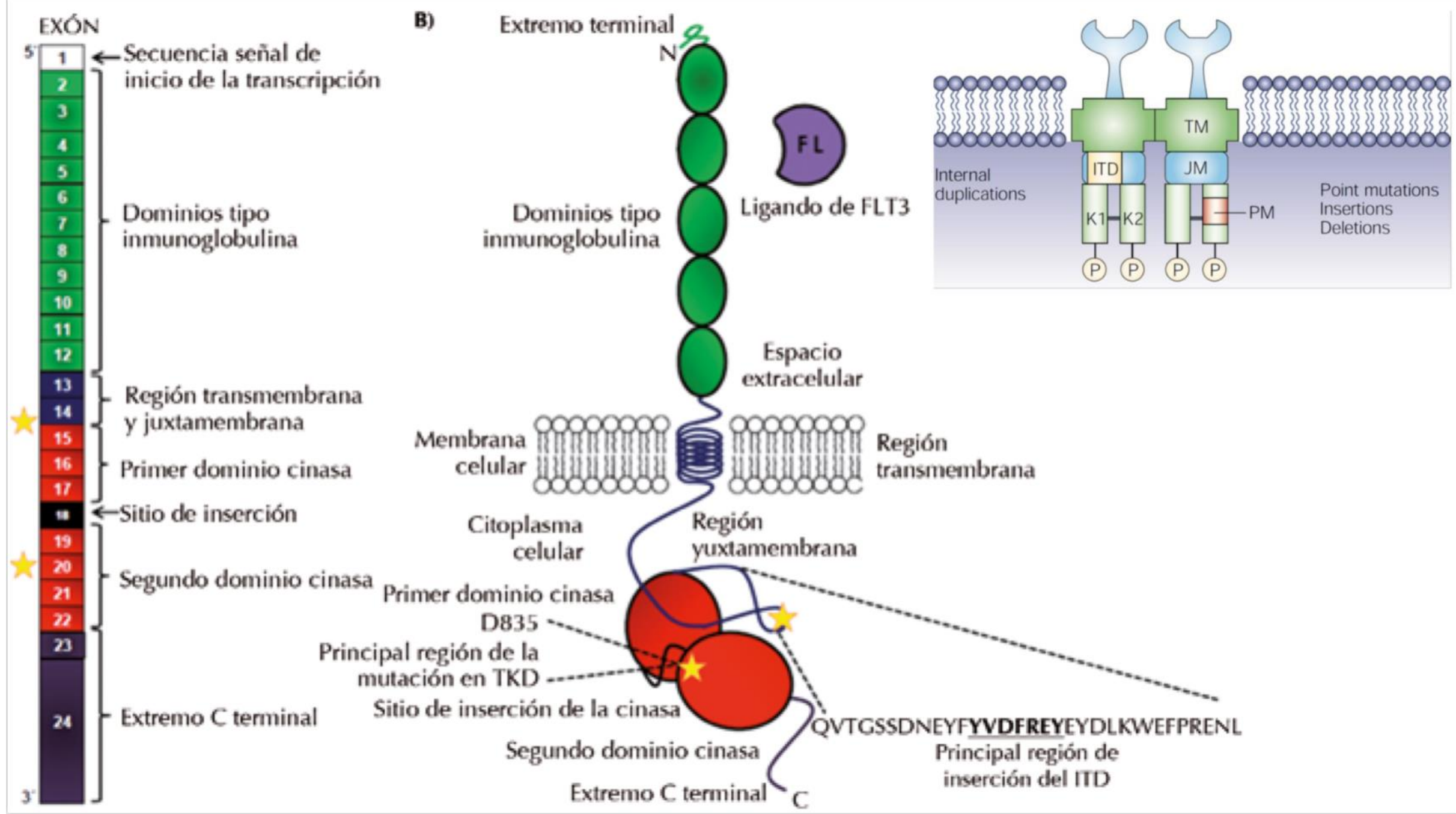
Duplicaciones internas en Tandem (FLT3-ITD)

- Región que codifica el dominio JM, determinada por la inserción de secuencias repetidas de aminoácidos (3 a 400pb) en el exón 14 y 15.
- Inserciones múltiplos de 3, siempre dentro del marco de lectura.
- La duplicación conduce a una débil actividad autoinhibitoria del dominio yuxtamembrana, dando como resultado un cambio conformacional de un estado inactivo a uno catalíticamente activo incluso en ausencia del ligando

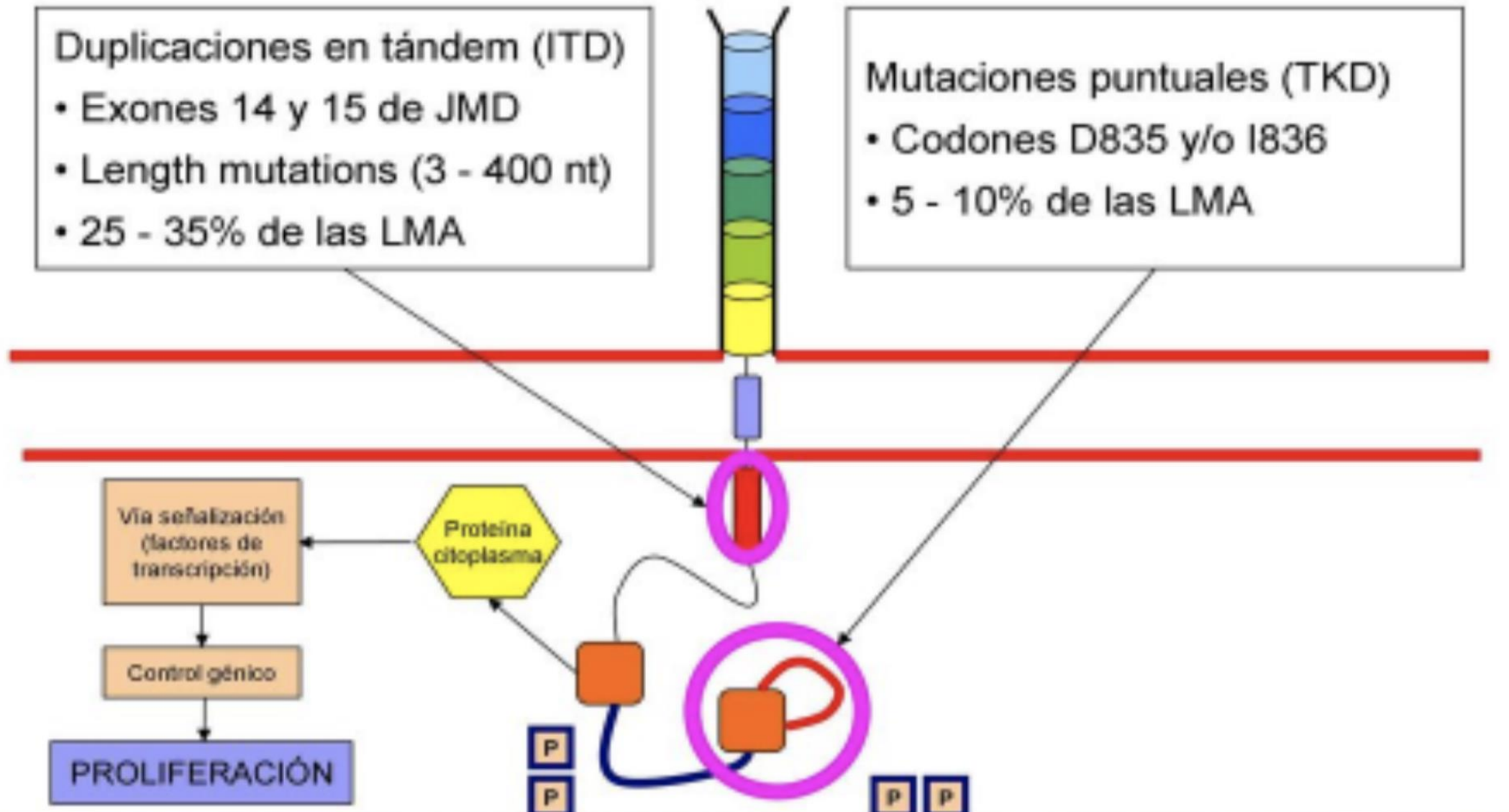
Mutaciones puntuales

- Sustitución de aa en el bucle de activación del TKD. Exón 20, en el codón del ácido aspártico D835 y la isoleucina I836. Otras mutaciones descritas en el codón 840 y 841.
- Las TKD interfieren con el efecto inhibidor del loop de activación, porque bloquean el acceso al ATP.
- Llevan a una activación constitutiva del receptor.





FLT3: Mutaciones





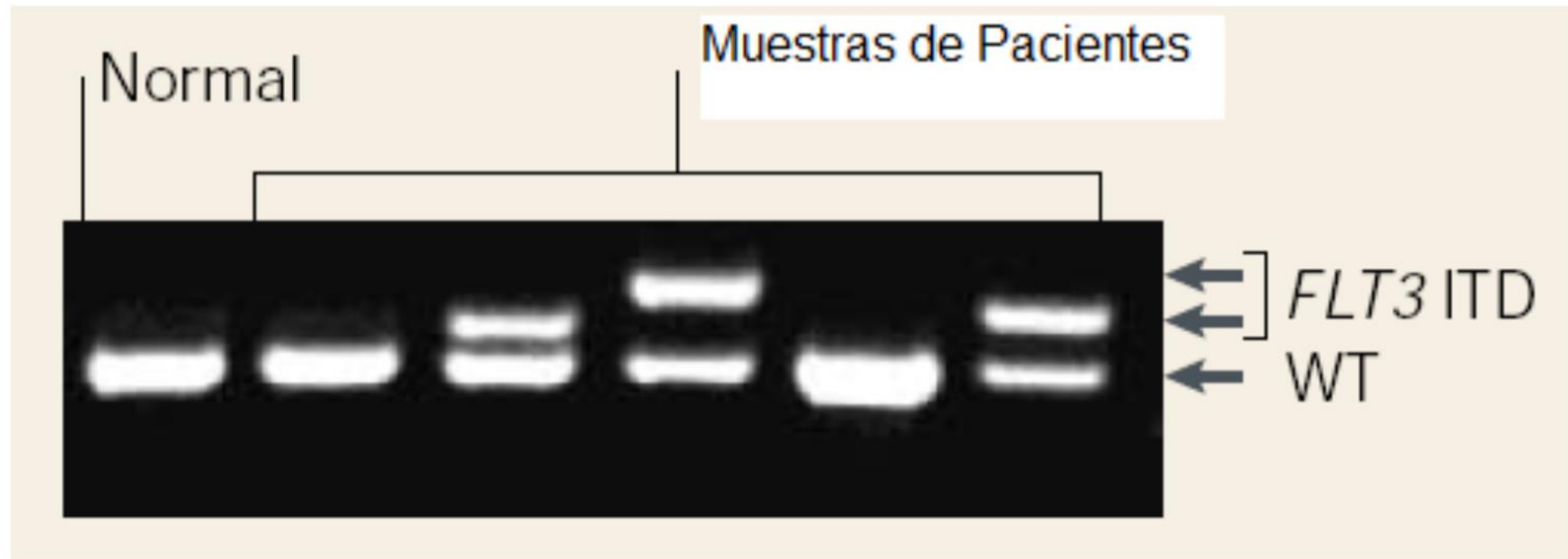
<i>FLT3</i> testing technique	Specificity for <i>FLT3</i> mutants	Sensitivity ^a	Turnaround time
Fluorescence-labeled polymerase chain reaction [50,51]	Highly specific (>99%); detects mutations only within amplified region	5%	3 d
Whole-genome sequencing [46,49]	Unbiased approach; detects <i>FLT3</i> -ITD and other <i>FLT3</i> mutants	>20%	7–12 d
Whole-exome sequencing [46]	Unbiased approach; detects <i>FLT3</i> -ITD and other <i>FLT3</i> mutants	>5%	Not reported; faster than whole-genome sequencing
Multiplex-targeted next-generation sequencing [46–48]	Unbiased approach; 99–100% detection of <i>FLT3</i> mutants	1–2%	3–20 d
Karyogene [45]	Highly specific (100%); samples are enriched for <i>FLT3</i> exons	>5%	<14 d ^b

FLT3: FMS-like tyrosine kinase 3; ITD: internal tandem duplication

^aDetection of mutant allele variants per fraction of total cells.

^bFor samples run once weekly; turnaround time can be <10 d for samples run twice weekly.

Electroforesis en gel de productos de PCR amplificación de exon 14 y 15 del gen FLT3

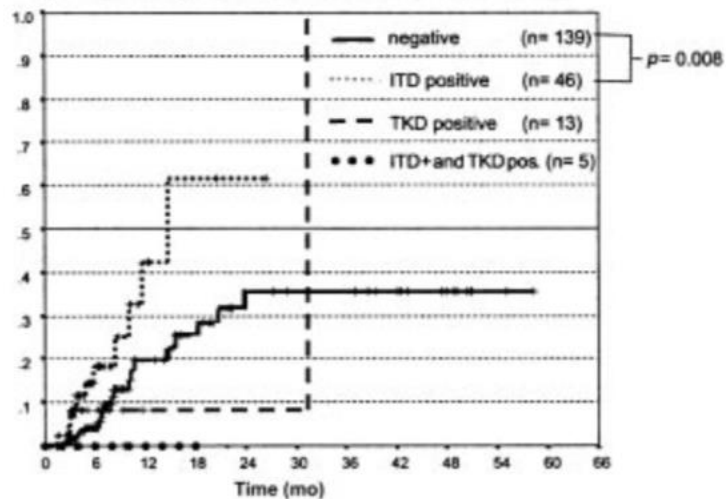


Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis : Presented in part at the 42nd Annual Meeting of the American Society of Hematology, December 1-5, 2000, San Francisco, CA (abstract 2334).

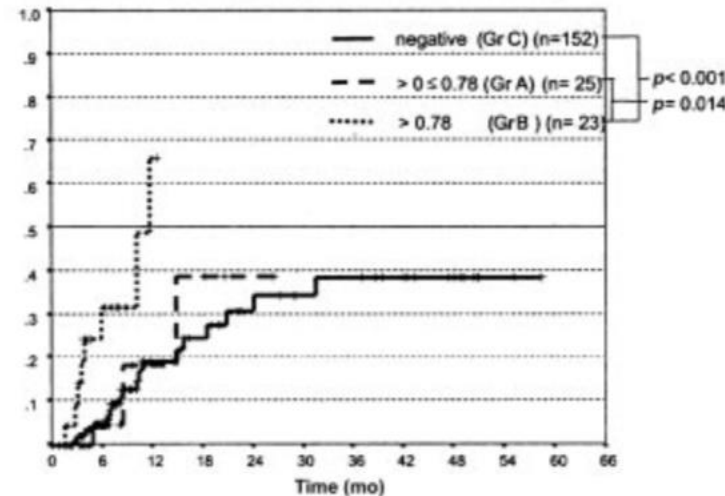
Christian Thiede, Christine Steudel, Brigitte Mohr, Markus Schaich, Ulrike Schäkel, Uwe Platzbecker, Martin Wermke, Martin Bornhäuser, Markus Ritter, Andreas Neubauer, Gerhard Ehninger and Thomas Illmer

Carga alélica

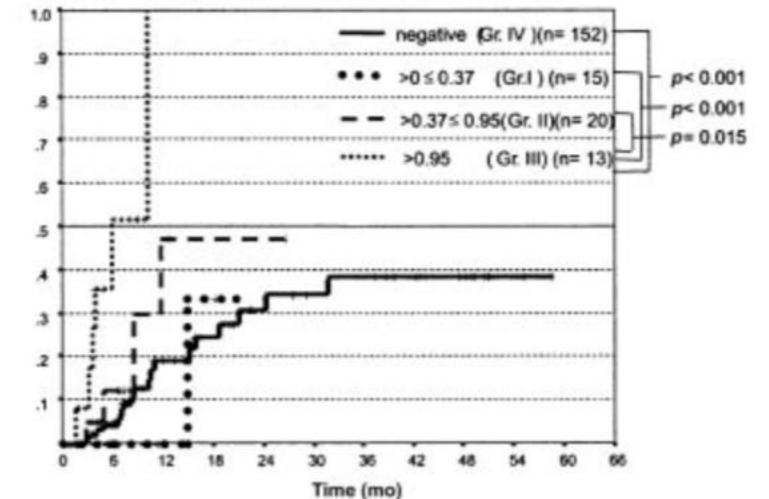
A
Probability of relapse, FLT3-ITD, TKD, ITD+/TKD mut
(patients ≤ 60 years, de novo AML, intermediate risk)



B
Probability of relapse ITD-ratio, 2 groups (A, B)
(patients ≤ 60 years, de novo AML, intermediate risk)



C
Probability of relapse ITD ratio, 3 groups (I, II, III)
(patients ≤ 60 years, de novo AML, intermediate risk)



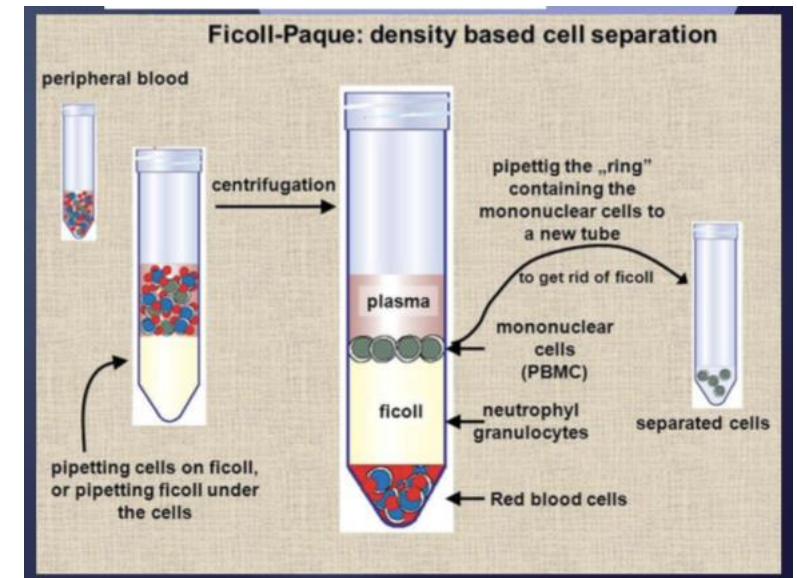
Detection of *FLT3* Internal Tandem Duplication and D835 Mutations by a Multiplex Polymerase Chain Reaction and Capillary Electrophoresis Assay

Kathleen M. Murphy,^{*} Mark Levis,[†]
Michael J. Hafez,^{*} Tanya Geiger,^{*}
Lisa C. Cooper,^{*} B. Douglas Smith,[†]
Donald Small,[†] and Karin D. Berg^{*†}

From the Departments of Pathology^{} and Oncology,[†] Johns
Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland*

Separacion de células mononucleares

- Ficoll Hypaque
- PCR y digestión
- Mix Electroforesis capilar
- Análisis de fragmentos



Extracción del ADN

- ADN total de la fracción de células mononucleares separadas
- Extracción de ADN de buena calidad, salting out
- Relación 260/280 \sim 1,8 nanodrop
- Diluir el ADN para que su CCf: 5-10 ng/ul
- 5-10ng de ADN / reacción

Determinación de FLT3

- Amplificación: PCR, detección en gel
- GeneScan, detección del Ratio

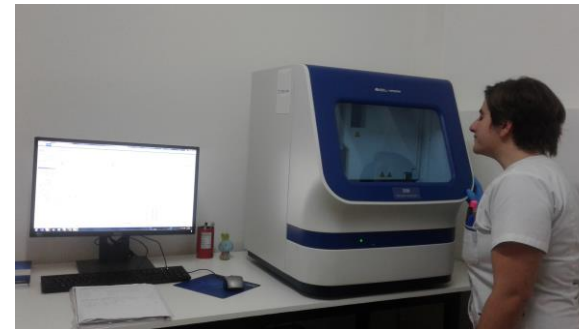
Factor pronóstico

Opción terapéutica:
determinación en tiempo
acorde a la toma de decisión

ABI 310
1 capilares



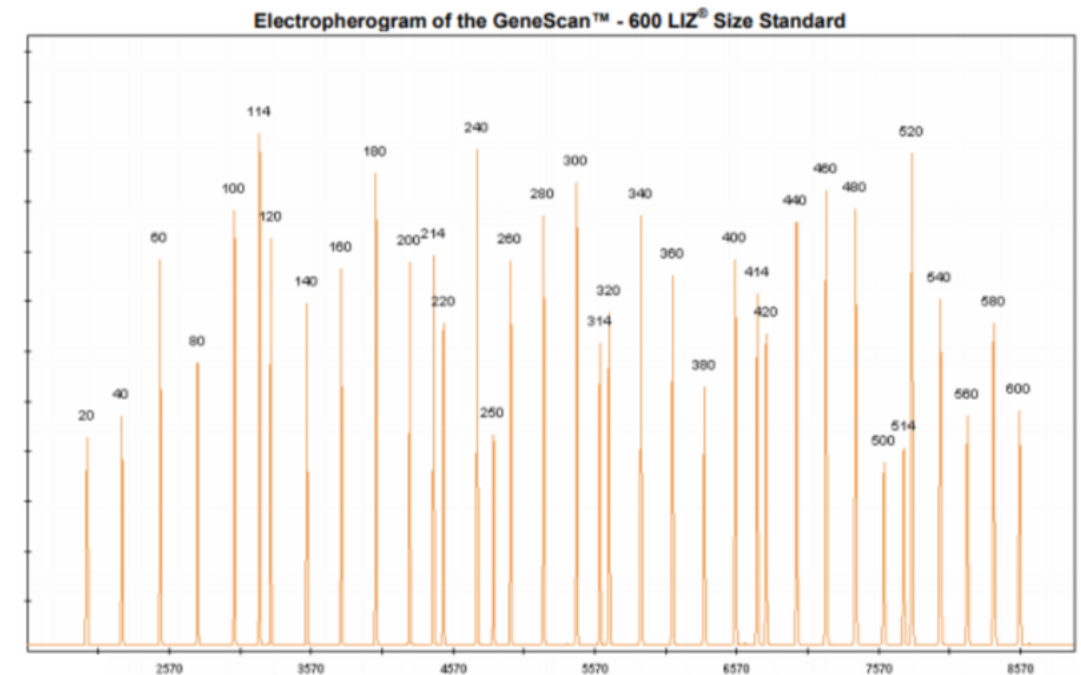
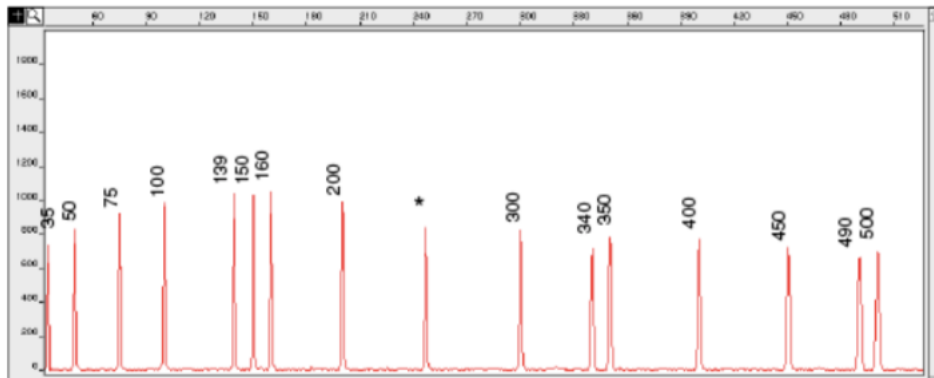
ABI 3500
8 capilares



Internal Size Standards: marcadores de PM para Electroforesis Capilar

GS 500- ROX (35 bp- 500 bp)

• **GS 600- LYZ (20bp-600bp)**





blood[®]

2014 124: 3441-3449
doi:10.1182/blood-2014-05-578070 originally published
online September 30, 2014

Differential impact of allelic ratio and insertion site in *FLT3*-ITD–positive AML with respect to allogeneic transplantation

Richard F. Schlenk, Sabine Kayser, Lars Bullinger, Guido Kobbe, Jochen Casper, Mark Ringhoffer, Gerhard Held, Peter Brossart, Michael Lübbert, Helmut R. Salih, Thomas Kindler, Heinz A. Horst, Gerald Wulf, David Nachbaur, Katharina Götze, Alexander Lamparter, Peter Paschka, Verena I. Gaidzik, Veronica Temeanu, Daniela Späth, Axel Benner, Jürgen Krauter, Arnold Ganser, Hartmut Döhner and Konstanze Döhner



Biology of Blood and
Marrow Transplantation

journal homepage: www.bbmt.org



Allogeneic Stem Cell Transplantation Improves Survival in Patients with Acute Myeloid Leukemia Characterized by a High Allelic Ratio of Mutant *FLT3*-ITD



Anthony D. Ho^{1,‡}, Johannes Schetelig^{2,*,‡}, Tilmann Bochtler¹, Markus Schaich², Kerstin Schäfer-Eckart³, Mathias Hänel⁴, Wolf Rösler⁵, Hermann Einsele⁶, Martin Kaufmann⁷, Hubert Serve⁸, Wolfgang E. Berdel⁹, Matthias Stelljes⁹, Jiri Mayer¹⁰, Albrecht Reichle¹¹, Claudia D. Baldus¹², Norbert Schmitz¹³, Michael Kramer², Christoph Röllig², Martin Bornhäuser², Christian Thiede^{2,‡}, Gerhard Ehninger^{2,‡}



blood[®]

2017 129: 424-447
doi:10.1182/blood-2016-08-733196 originally published
online November 28, 2016

Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel

Hartmut Döhner, Elihu Estey, David Grimwade, Sergio Amadori, Frederick R. Appelbaum, Thomas Büchner, Hervé Dombret, Benjamin L. Ebert, Pierre Fenaux, Richard A. Larson, Ross L. Levine, Francesco Lo-Coco, Tomoki Naoe, Dietger Niederwieser, Gert J. Ossenkoppele, Miguel Sanz, Jorge Sierra, Martin S. Tallman, Hwei-Fang Tien, Andrew H. Wei, Bob Löwenberg and Clara D. Bloomfield

Carga alélica

Area del pico FLT3 mutado/Area del pico FLT3 wt

- Carga alélica alta $> 0,5$
- Carga alélica baja $< 0,5$
- Carga alélica $< 0,05$: wt

Carga alélica

Está influenciado por:

- Cantidad de células malignas versus células no malignas.
- % Células con 0, 1, o 2 alelos mutados.

Como la LMA es una enfermedad policlonal al diagnóstico pueden existir distintas posibilidades:

- Células heterocigotas para la mutación.
- Células que no posean la mutación.
- Células Bialélicas
- Células hemicigotas (perdida de un cromosoma 13 o delección).

Carga alélica de FLT3 mut en LMA

Allelic ratio – Signal ratio

► Pronóstico

Carga alélica alta ≥ 0.50 ---- Riesgo alto

Carga alélica baja < 0.50 ---- Riesgo bajo

Área del pico de alelos FLT3 mutados / Área del pico alelo FLT3 normal

Duplicados (Europa realizan triplicados)

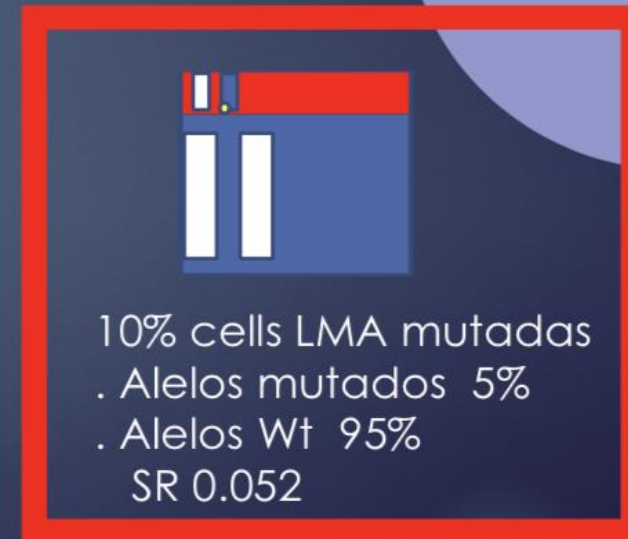
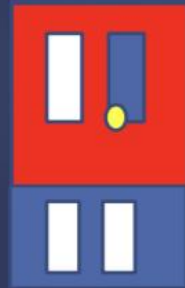
Resultado cociente entre : \sum áreas de las réplicas de los picos

Clones FLT3 mutados

Especulación teórica – 1 Mutación Heterocigota



100% células LMA mutadas
Del total de alelos FLT3:
· Alelos mutados 50%
· Alelos Wt 50%
CA= 1.0



CA Rango lineal : 0.05 - 1.00

Estrategias



Amplificar ITD y TKD en la misma reacción de PCR

Electroforesis en gel

Digestión Enzimática de todos los productos

Corrida electroforética en un solo pocillo o tubo



Amplificar por separado ITD de TKD

Electroforesis en gel

Digestión Enzimática solo de TKD

Corrida electroforética de los productos por separado

Utilización de Controles

Muestra normal

Control Positivo de ITD como TKD

Blanco de Reacción

Informe

- Presencia o ausencia de mutación
- Si hay presencia: ITD o TKD
- ITD: el tamaño no se informa
- Carga alélica sin estratificación de riesgo

Table 5. 2017 ELN risk stratification by genetics

Risk category*	Genetic abnormality
Favorable	t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> Mutated <i>NPM1</i> without <i>FLT3</i> -ITD or with <i>FLT3</i> -ITD ^{low} † Biallelic mutated <i>CEBPA</i>
Intermediate	Mutated <i>NPM1</i> and <i>FLT3</i> -ITD ^{high} † Wild-type <i>NPM1</i> without <i>FLT3</i> -ITD or with <i>FLT3</i> -ITD ^{low} † (without adverse-risk genetic lesions) t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i> ‡ Cytogenetic abnormalities not classified as favorable or adverse
Adverse	t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i> t(v;11q23.3); <i>KMT2A</i> rearranged t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2,MECOM(EVI1)</i> –5 or del(5q); –7; –17/abn(17p) Complex karyotype,§ monosomal karyotype Wild-type <i>NPM1</i> and <i>FLT3</i> -ITD ^{high} † Mutated <i>RUNX1</i> ¶ Mutated <i>ASXL1</i> ¶ Mutated <i>TP53</i>

Frequencies, response rates, and outcome measures should be reported by risk category, and, if sufficient numbers are available, by specific genetic lesions indicated.

*Prognostic impact of a marker is treatment-dependent and may change with new therapies.

†Low, low allelic ratio (<0.5); high, high allelic ratio (≥0.5); semiquantitative assessment of *FLT3*-ITD allelic ratio (using DNA fragment analysis) is determined as ratio of the area under the curve “*FLT3*-ITD” divided by area under the curve “*FLT3*-wild type”; recent studies indicate that AML with *NPM1* mutation and *FLT3*-ITD low allelic ratio may also have a more favorable prognosis and patients should not routinely be assigned to allogeneic HCT.^{57-59,77}

‡The presence of t(9;11)(p21.3;q23.3) takes precedence over rare, concurrent adverse-risk gene mutations.



Mutaciones de NPM1 son beneficiosas

AR: allelic ratio

Impacto de Mutaciones del gen FLT3 y de su Carga Alélica

► FLT3 (+) Midostaurin a la Qt

► Carga alélica
alta vs baja

Pronóstico – Riesgo

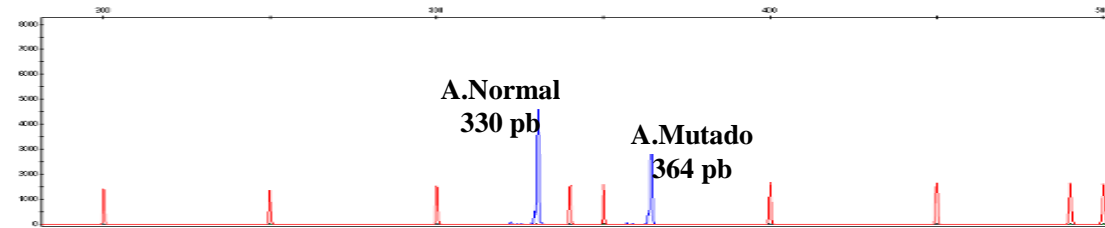
Mutaciones de NPM1

Método Thiede

GENESCAN (Thiede *et al.* Blood 2002; 99:4326-35)

1-Amplificación por PCR de los exones 11 y 12 del gen FLT3 en donde recaen las duplicaciones parciales en tándem con primers marcados con fluorógenos (6-FAM)

2-Análisis de fragmentos (**Electroforesis Capilar**)



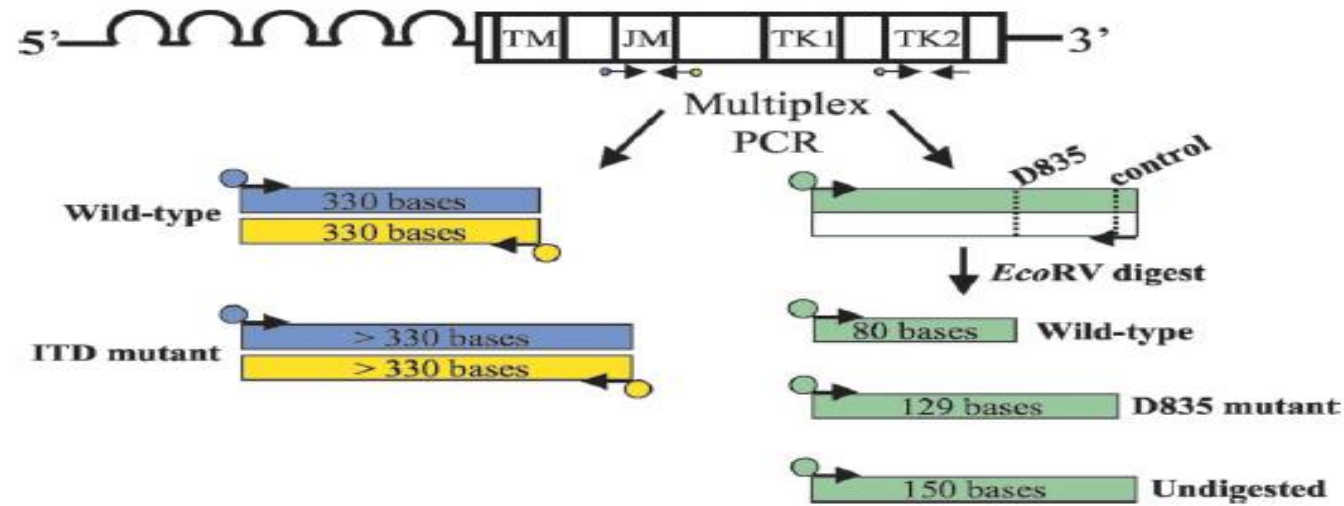
3-Cálculo de ratio ITD mutante/salvaje **Area Mutado** 23917/**Area WT** 28301= 0.84

Ratio > 0,5 ELN → menor sobrevida global (SO)

→ menor sobrevida libre de enfermedad (SLE)

MUESTRA: SP o MO con EDTA
(tubo de hemograma nuevo)

Detección simultánea de FLT3-ITD y de la mutación D835 por PCR multiplex y EC (Murphy)



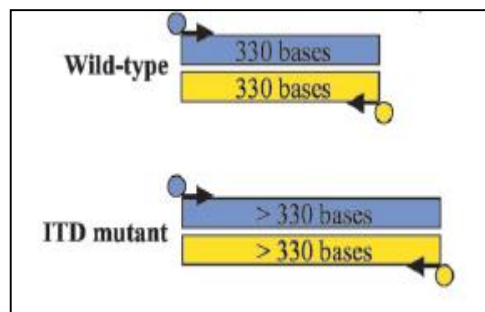
ITD: 11F-FAM y 12R-HEX

D835: M13F-TET y M13R-S/M

Digestión con enzimas de restricción EcoRV (10U/uI)

Análisis de fragmentos por Electroforesis Capilar

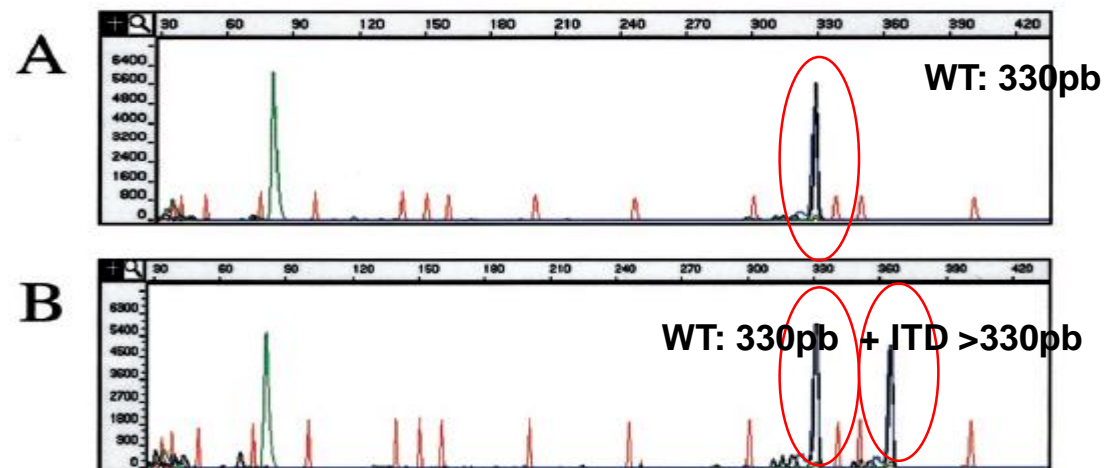
FLT3-ITD: interpretación de los resultados



11F y 12R marcados para aumentar sensibilidad y especificidad :

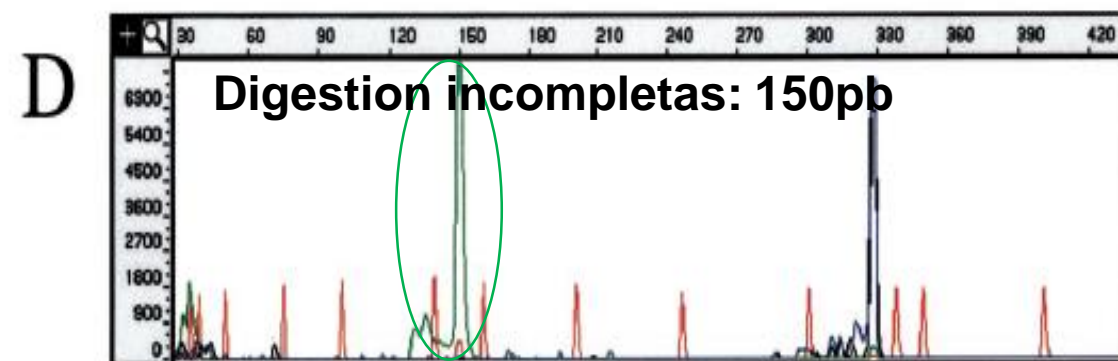
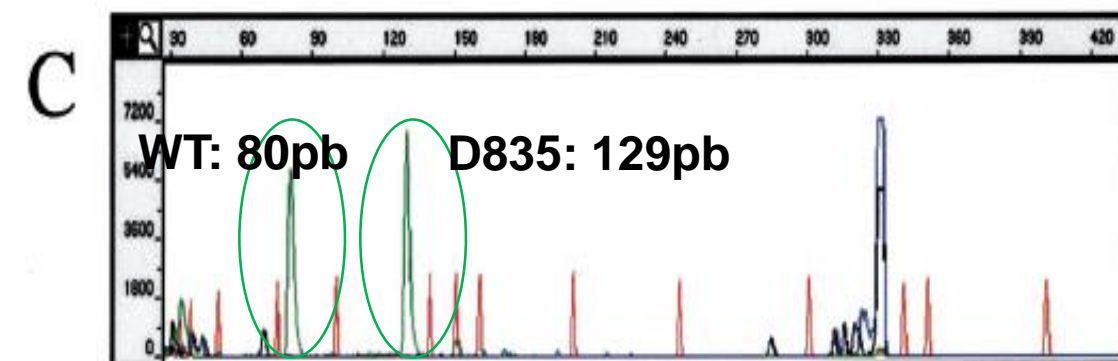
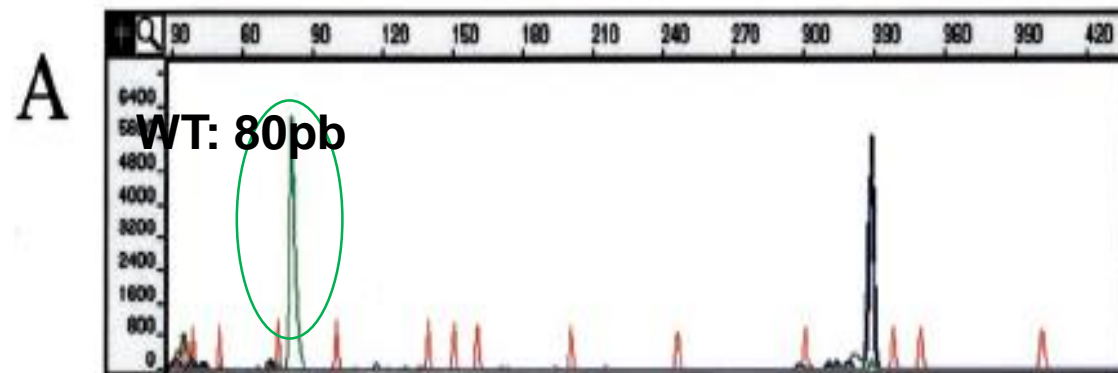
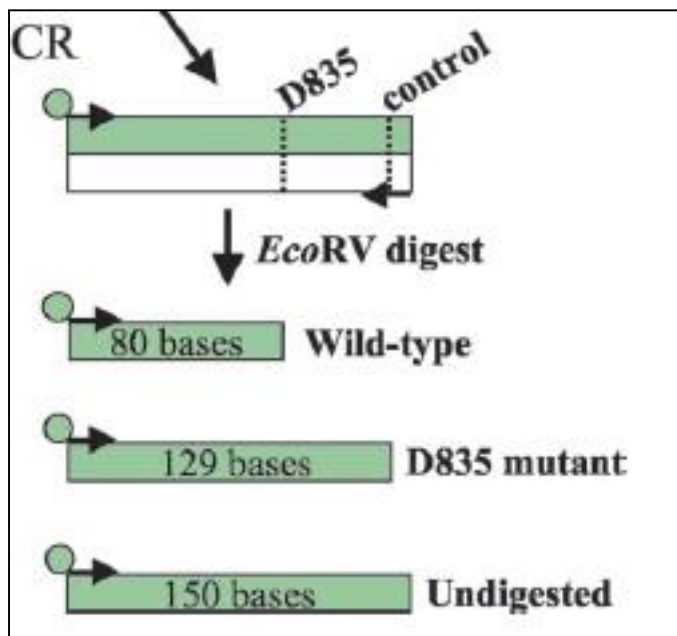
Falso Positivo: ambos picos se deben ver en las 2 fluorescencias

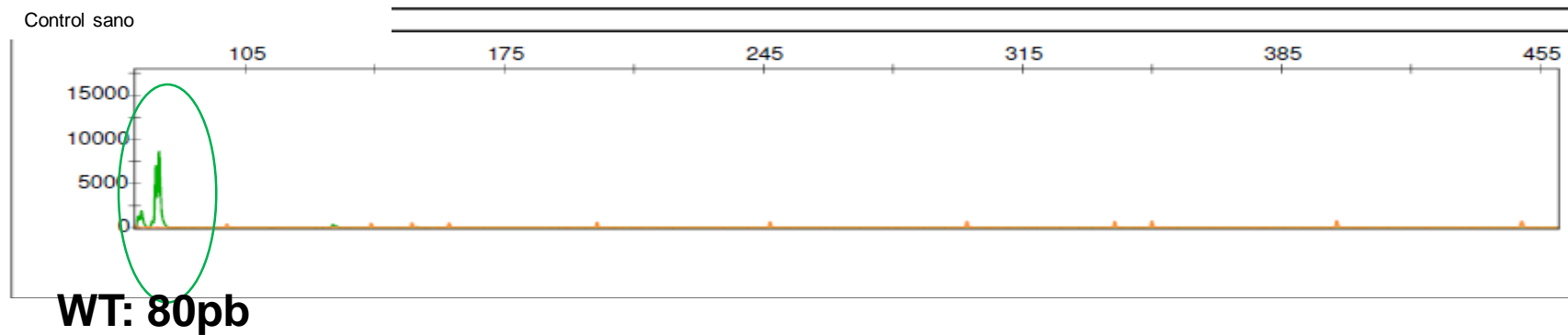
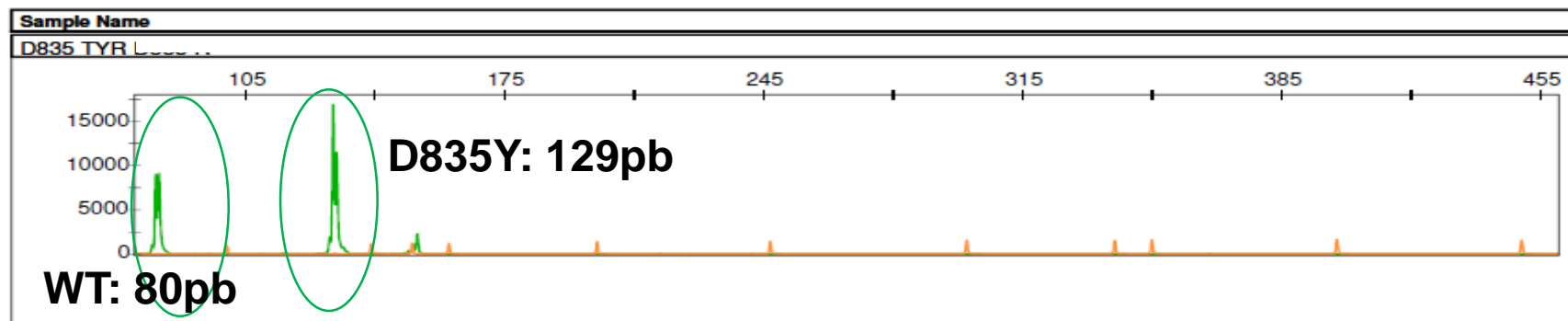
Falso Negativo: Si debido a las ITD se creara un sitio de corte para la enzima 330pb (improbable pero . . .)



FLT3 D835: interpretación de los resultados

13Fw marcados y Rv sin marcar



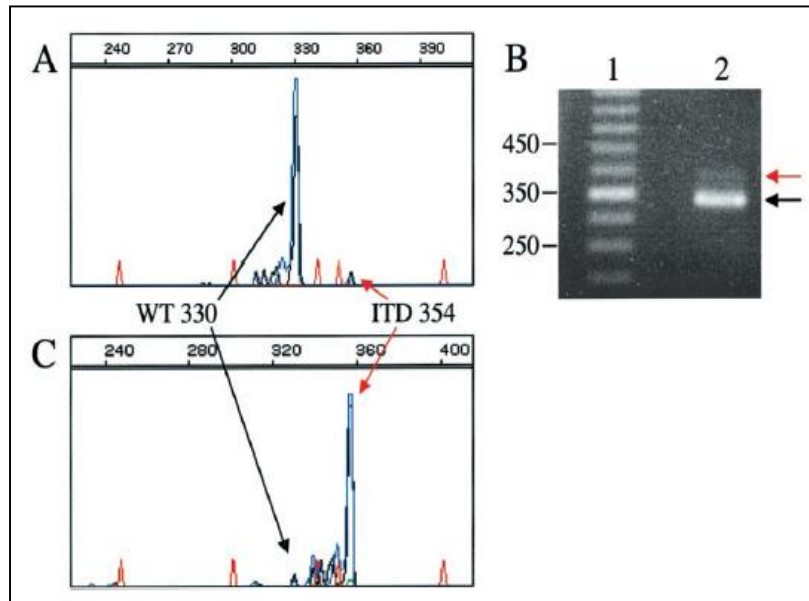


Validación de la técnica Murphy

- ✓ **26 muestras de 23 pacientes LMA**
- ✓ **25 donantes sanos, no mutaciones (0/25)**
 - 15/26 WT para FLT-ITD y D835 (58%)
 - 10/26 FLT3-ITD (38%)
 - 1/26 (4%) FLT3 D835
- ✓ **FLT3-ITD tamaño: 18-183 → 5 confirmadas por Sanger**
- ✓ **FLT3-D835: confirmada por Sanger**
- ✓ **100% concordancia PCR-multiplex y PCR simple**
- ✓ **Límite menor de sensibilidad: población 100% patológica (heterocigota para ITD o D835 → diluciones en DNA wt)**
 - 1:12 (10% células patológicas) y hasta 1:24 (5%)
 - Resultado negativo: >3000 RFU solo un pico
 - Resultado positivo: >0= 150 RFU (5%) en el pico patológico.

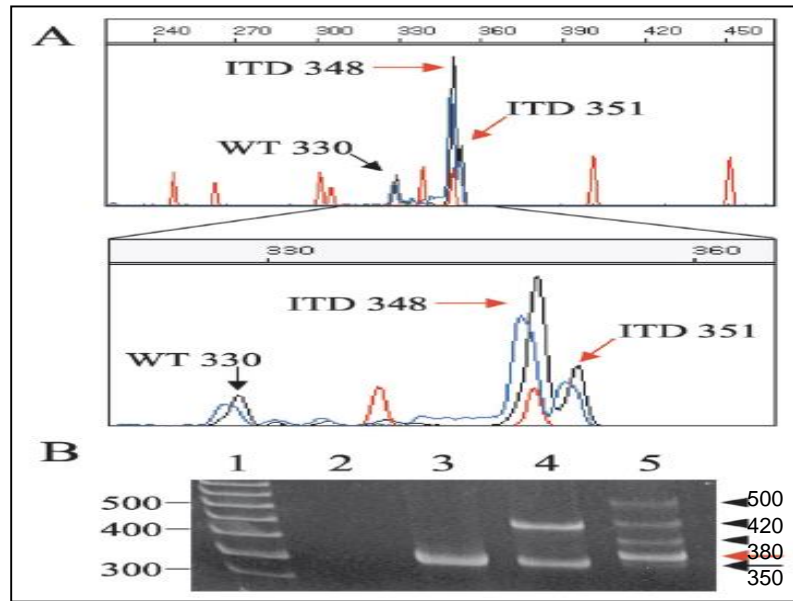
Sensibilidad- resolución

Caso 1: alta sensibilidad



Corte/reamplificación y EC
Nota al médico: el bajo nivel de la mutación se correlaciona con el bajo % de blastos que presenta el paciente.

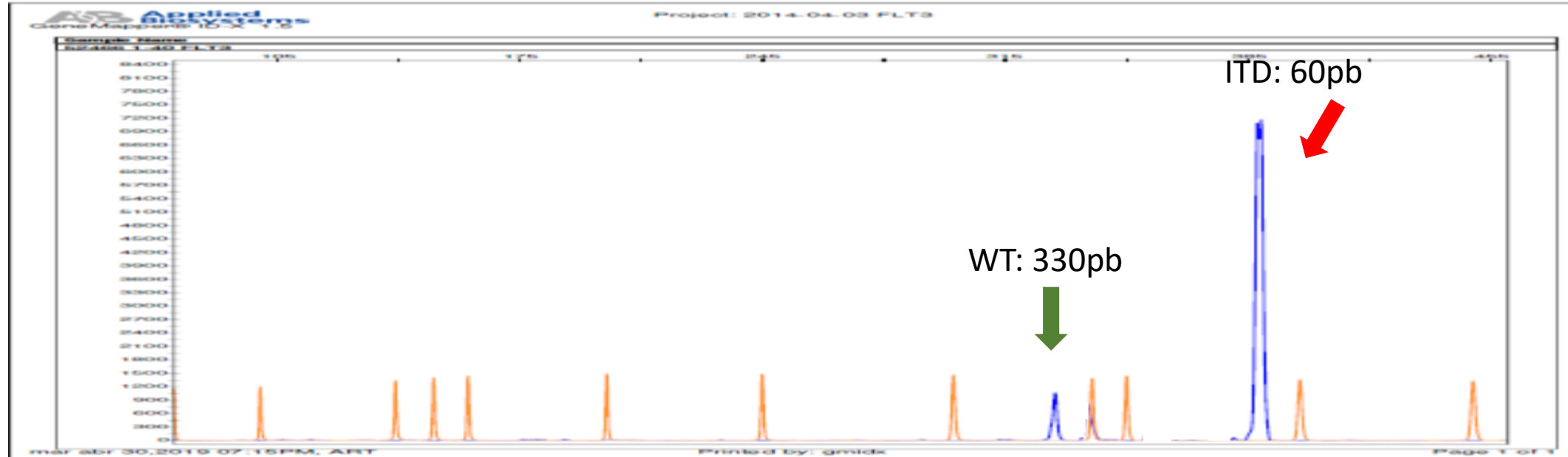
Caso 2: buena resolución



Corte/reamplificación y EC
Las bandas resultaron mezcla entre 348/351 y wt/348/351
Formación de heteroduplex

FLT3-ITD: RATIO >1

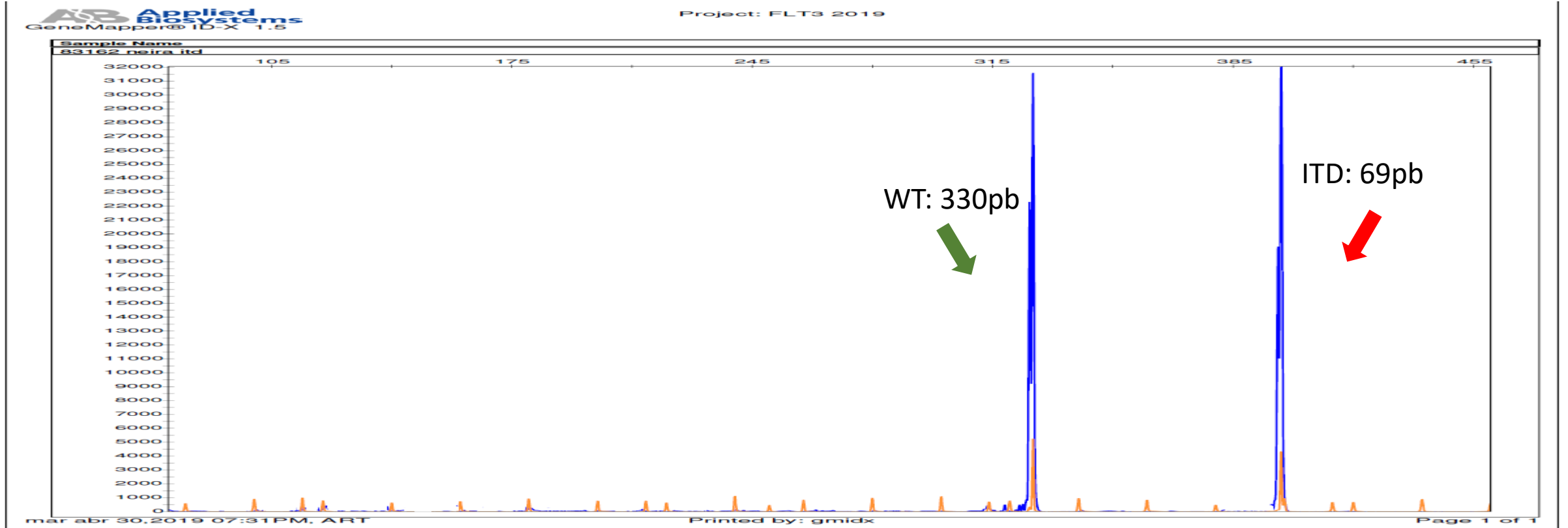
2014: protocolo Thiede. ABI310



**RATIO: AREA BAJO CURVA MUT/ AREA BAJO CURVA WT
: 78169/13138 = 5,94**

FLT3-ITD: RATIO =1

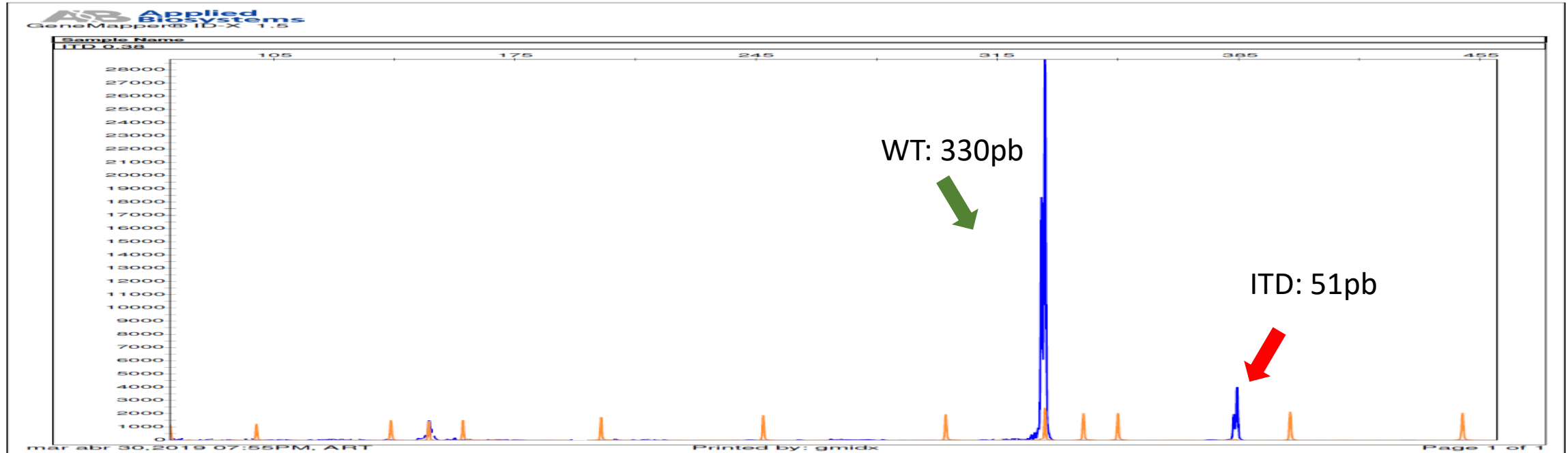
2019: protocolo Murphy- ABI3500



RATIO: AREA BAJO CURVA MUT/ AREA BAJO CURVA WT
: 126121/126121 = 1

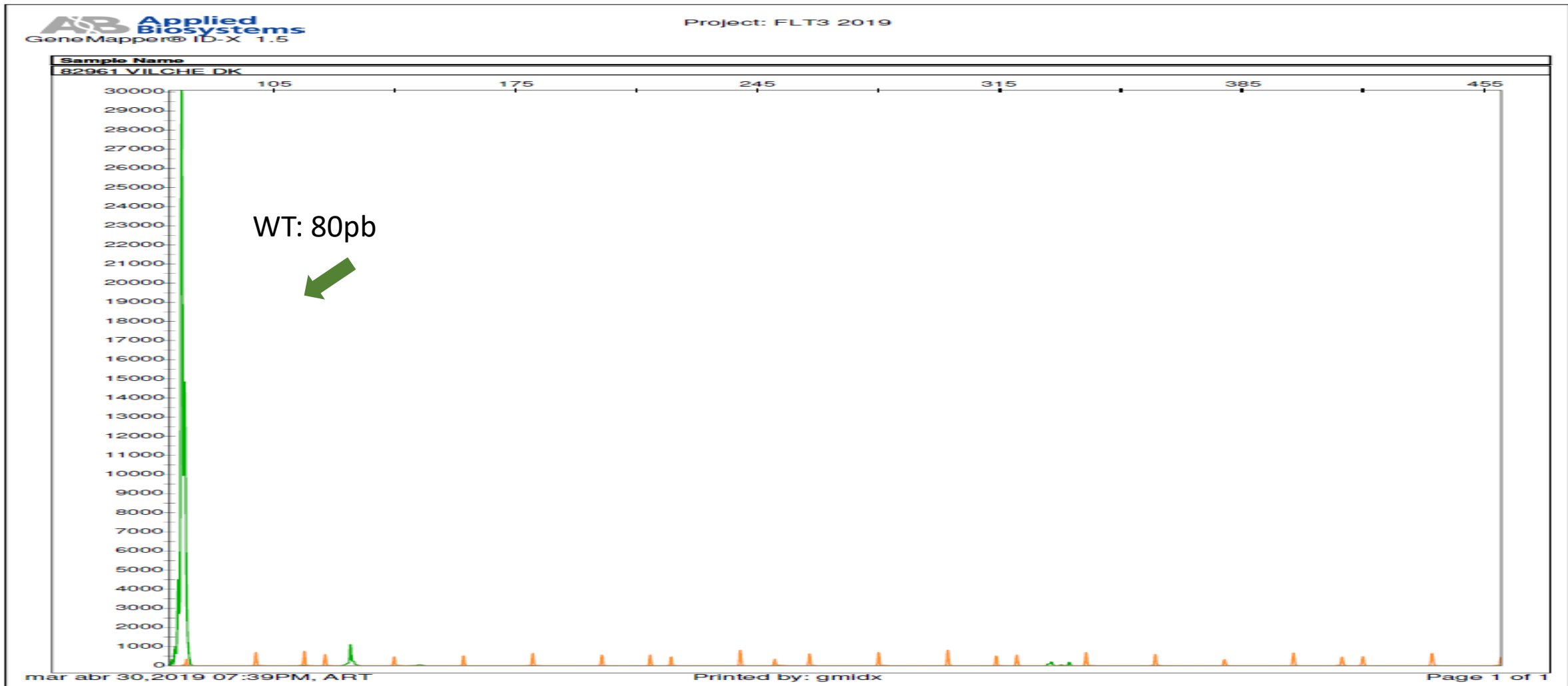
FLT3-ITD: RATIO < 0,5

2019: protocolo Murphy- ABI3500

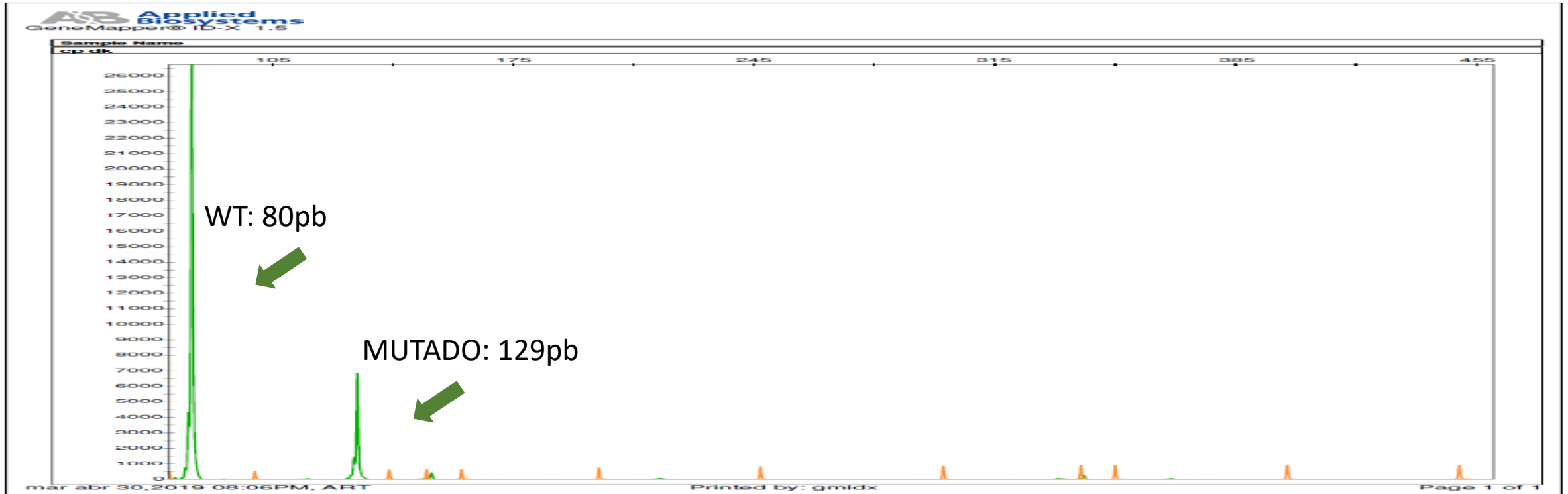


**RATIO: AREA BAJO CURVA MUT/ AREA BAJO CURVA WT
: 25429/170100 = 0,15**

FLT3-TKD: WT



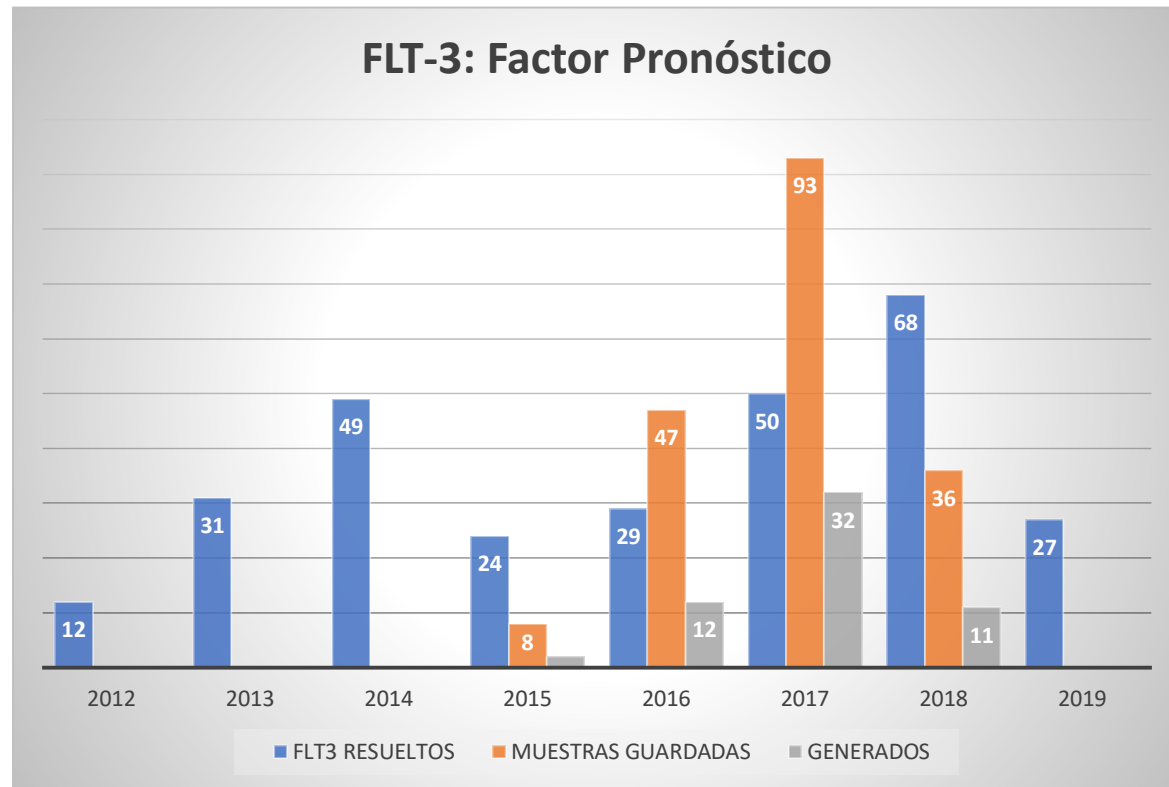
FLT3-TKD: MUTADO



Discusión-Conclusiones

- ✓ Método fiable y robusto para detección simultanea de ambas mutaciones: FLT3-ITD y D385
 - ✓ 36hs . . . 48hs
 - ✓ Buena sensibilidad (10% de células patológicas, y hasta 5%) con optima resolución
 - ✓ El uso de ambos primers marcados para FLT3-ITD aumenta la especificidad del ensayo
 - ✓ Ensayo recomendado para el diagnóstico pero no para EMR
 - ✓ La determinación del FLT3 Ratio estratifica riesgo de los pacientes con LMA
- . . . y HOY amplia las opciones terapéuticas disponibles.

FLT3-ITD: factor pronóstico



ITD MUTADAS		
	N	%
TAMAÑO ITD		25
	Promedio	51
	Rango	12-108
RATIO	Promedio	1
	Rango	13-0,1
CONCOMITANCIA CON NPM1	30%	

Muestras totales: 405

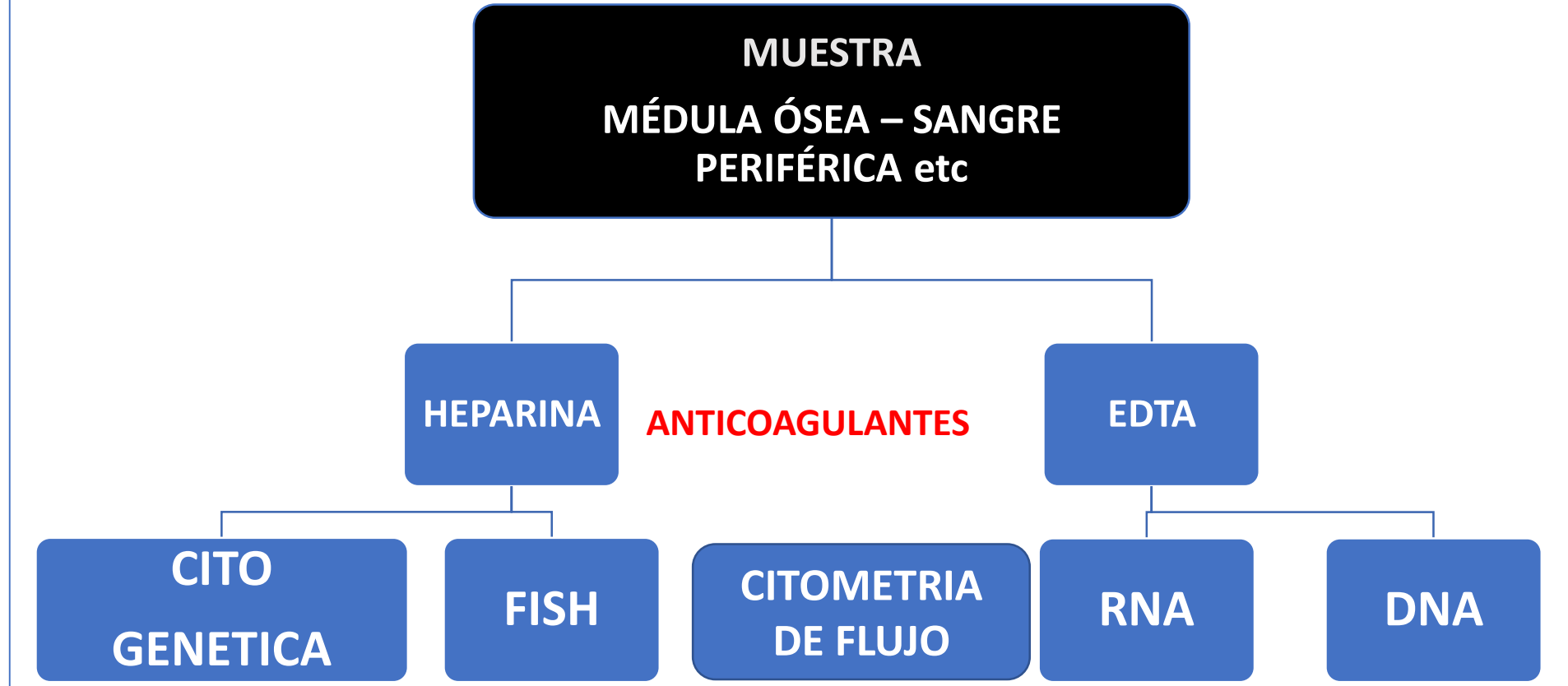
(LMA c/EDTA y disponibilidad de células)

Muestras analizadas: 221

25% MUTADOS ITD

**todas con
resultados
evaluables**

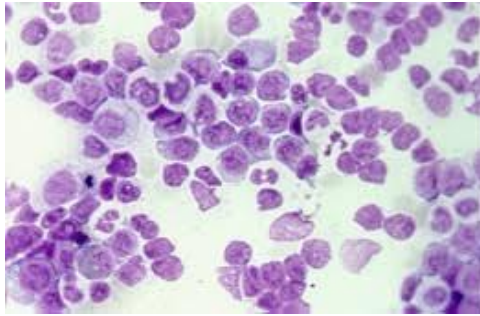
Diagnóstico hematológico



FLT3

Algoritmo de trabajo

Día 0: LMA



→ Muestra con EDTA



Día 1: Llega al laboratorio → Extracción DNA

Día 2: PCR y digestión,

Día 3: EC e interpretación



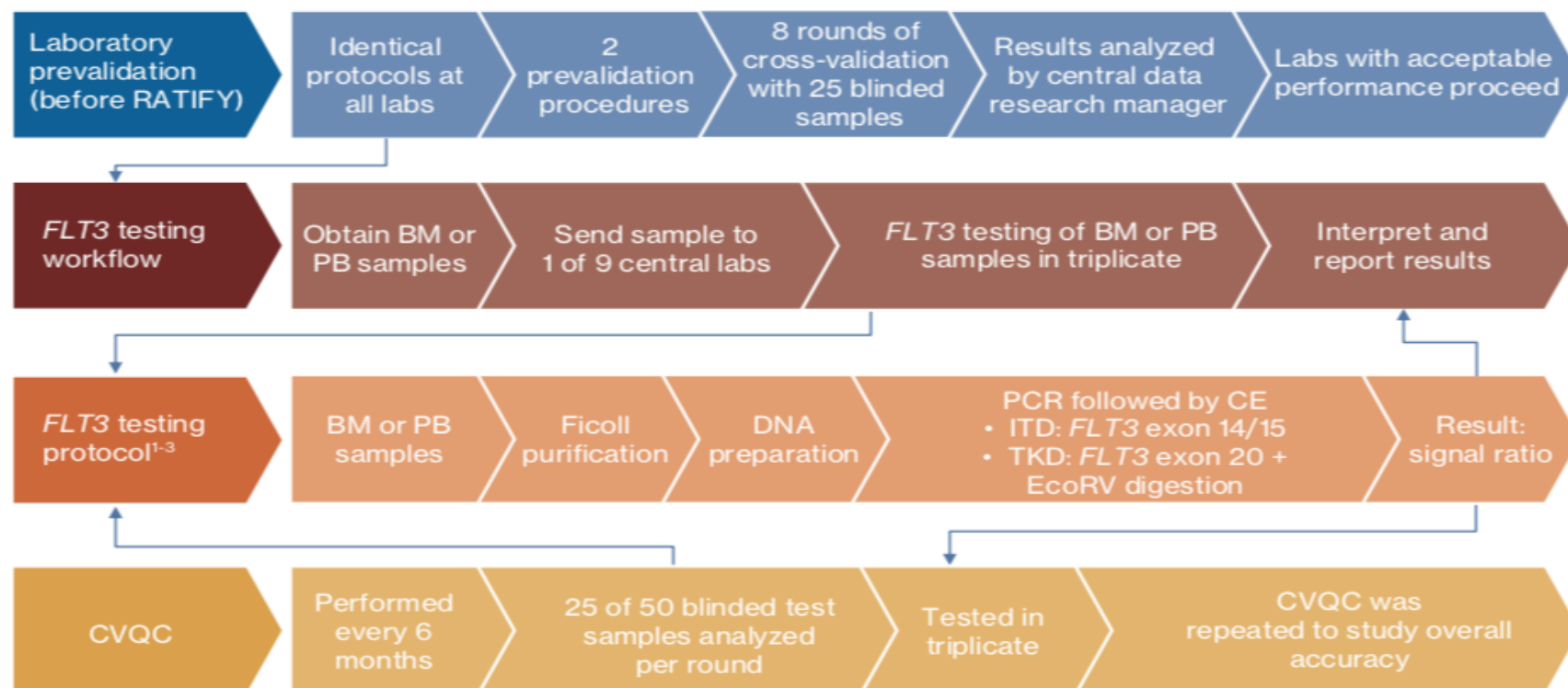
36 hs proceso. . .

FLT3 Mutation Assay Laboratory Cross-Validation: Results From the CALGB 10603/RATIFY Trial in Patients With Newly Diagnosed *FLT3*-Mutated Acute Myeloid Leukemia (AML)

Christian Thiede,¹ Thomas W. Prior,² Francesco Lo-Coco,³ Jürgen Krauter,⁴ Eva Barragán,⁵ Josep Nomdedeu,⁶ Joop H. Jansen,⁷ Andrew Wei,⁸ Weiqiang Zhao,² Xiaohong Li,⁹ Celine Pallaud,⁹ Eva Tiecke,⁹ Richard A. Larson,¹⁰ Clara D. Bloomfield,² Hartmut Döhner,¹¹ Gerhard Ehninger,¹ Richard M. Stone,¹² Konstanze Döhner¹¹

¹Medizinische Klinik und Poliklinik I, Universitätsklinikum Carl Gustav Carus der TU Dresden, Dresden, Germany; ²Comprehensive Cancer Center, The Ohio State University, Columbus, OH; ³Department of Biomedicine and Prevention, University Tor Vergata, Rome, Italy; ⁴Department of Hematology, Hemostasis, Oncology and Stem Cell Transplantation, Hannover Medical School, Hannover, Germany; ⁵Department of Hematology, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia, Spain; ⁶Hematology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Autonomous University of Barcelona, Barcelona, Spain; ⁷Department of Laboratory Medicine, Laboratory of Hematology, Radboud University Medical Center, Nijmegen, the Netherlands; ⁸Department of Clinical Haematology, Alfred Hospital and Monash University, Melbourne, VIC, Australia; ⁹Novartis Pharma AG, Basel, Switzerland; ¹⁰Comprehensive Cancer Center, University of Chicago, Chicago, IL; ¹¹Department of Internal Medicine III, University Hospital of Ulm, Ulm, Germany; ¹²Department of Medical Oncology, Dana-Farber/Partners CancerCare, Boston, MA

Figure 1. *FLT3* Testing During CALGB 10603/RATIFY⁷⁻⁹



BM, bone marrow; CVQC, cross-validation quality control; PB, peripheral blood.

Gracias por su atención!!!

LEB laboratorio
bmolecular@leblaboratorio.com.ar